

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 21620131152633

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

# 乙型肝炎病毒 HBx 蛋白类 BH3 结构域肽段与 Bcl-xL 相互作用的结构与功能研究

The structural analysis and functional study of the  
interaction between Hepatitis B virus X protein BH3-like  
domain and Bcl-xL protein

张莹

指导教师姓名: 夏宁邵 教授

专 业 名 称 : 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2016 年 5 月

论文答辩时间: 2016 年 5 月

学位授予日期: 2016 年 6 月

答辩委员会主席: 赵勤俭 教授

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2016 年 6 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

# 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于        年        月        日解密，解密后适用上述授权。

（    ☒    ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年        月        日

# 目录

摘要 .....	I
Abstract .....	III
缩写词 .....	V
第一章 前言 .....	1
一、乙型肝炎病毒概述 .....	1
1. HBV 病毒基因组及病毒结构 .....	1
2. HBV 病毒蛋白及其功能 .....	2
3. HBV 生命周期及致病机理 .....	4
4. HBV 全球流行情况 .....	6
二、HBx 结构及功能 .....	8
1. HBx 蛋白结构及分布 .....	8
2. HBx 在 HBV 生活史中的功能 .....	9
3. HBx 与 HCC 相关性研究 .....	13
三、Bcl-2 蛋白家族 .....	15
1. Bcl-2 家族及蛋白结构 .....	15
2. 关于 Bcl-2/Bcl-xL 蛋白功能的研究 .....	16
3. Bcl-2/Bcl-xL 蛋白在乙肝中的作用 .....	17
四、本研究的目的及意义 .....	18
第二章 材料和方法 .....	20
一、材料 .....	20
1. 主要仪器 .....	20
2. 主要耗材及材料 .....	21
3. 常用试剂及溶液 .....	22
4. 实验动物 .....	27
二、方法 .....	27

1. 分子克隆相关 .....	27
2. 重组蛋白相关 .....	33
3. 酶联免疫吸附法(ELISA)及化学发光酶联免疫分析(CLEIA) .....	37
4. 细胞生物学相关 .....	38
5. 动物实验相关 .....	41
<b>第三章 结果与分析 .....</b>	<b>45</b>
<b>一、HBx 的类 BH3 结构域(HBx113-135)与 Bcl-xL 蛋白复合物的结构 ....</b>	<b>45</b>
1. Bcl-xL 蛋白的制备 .....	45
2. HBx 相关肽段的合成 .....	46
3. HBx113-135 肽段与 Bcl-xL 复合物的晶体培养 .....	47
4. HBx113-135 肽段与 Bcl-xL 复合物的晶体结构解析 .....	47
<b>二、HBx 类 BH3 结构域与 Bcl-xL 蛋白结合的功能性分析 .....</b>	<b>50</b>
1. HBx 类 BH3 结构域肽段与 Bcl-xL 相互作用的生物学验证 .....	50
2. HBx 类 BH3 结构域肽段体外促进 HBV 的复制及表达研究 .....	54
3. HBx 类 BH3 结构域肽段在有机体内对 HBV 的影响探究 .....	59
4. Bcl-xL 的小分子抑制剂(ABT263/ABT737)体外对 HBV 影响的初步探究 .....	61
<b>第四章 讨论 .....</b>	<b>65</b>
<b>一、HBx 类 BH3 结构域与 Bcl-xL 相互作用的关键氨基酸位点 .....</b>	<b>65</b>
<b>二、HBx113-135 肽段对 HBV 生活史的影响 .....</b>	<b>66</b>
<b>三、Bcl-xL 小分子抑制剂用于慢乙肝治疗 .....</b>	<b>67</b>
<b>四、HBx 类 BH3 结构域肽段与 Bcl-xL 相互作用研究对 HBV 治疗的指导意义 .....</b>	<b>69</b>
<b>小结与展望 .....</b>	<b>70</b>
<b>参考文献 .....</b>	<b>82</b>

## Table of Contents

<b>Abstract in Chinese .....</b>	<b>I</b>
<b>Abstract in English.....</b>	<b>III</b>
<b>Abbreviations.....</b>	<b>V</b>
<b>Chapter 1:Perface .....</b>	<b>1</b>
<b>一、 Overview of Heptitis B virus .....</b>	<b>1</b>
1. Viral genome and virus structure of HBV .....	1
2. Virus proteins and their function of HBV .....	2
3. Pathogenesis and life cycle of HBV .....	4
4. The global epidemic of HBV infection.....	6
<b>二、 Protein structure and function of HBx.....</b>	<b>8</b>
1. HBx structure and tissue distribution.....	8
2. Function of HBx in HBV life cycle .....	9
3. Association between HBx and HCC.....	13
<b>三、 Bcl-2 protein family.....</b>	<b>15</b>
1. Bcl-2 family and protein structure .....	15
2. Study about Bcl-2/Bcl-xL functions .....	16
3. Bcl-2/Bcl-xL in HBV infection .....	17
<b>四、 Purpose and significance of this research .....</b>	<b>18</b>
<b>Chapter 2: Materials and Methods.....</b>	<b>20</b>
<b>一、 Materials .....</b>	<b>20</b>
1. Instruments.....	20
2. Materials and consumables .....	21
3. Commonly used reagents and solutions.....	22
4. Experimental animal .....	27

<b>二、 Methods .....</b>	<b>27</b>
1. Molecular cloning .....	27
2. Recombination protein.....	33
3. ELISA and CLEIA.....	37
4. Manipulations on cells .....	38
5. Animal experiments.....	41
<b>Chapter 3: Results and Analysis .....</b>	<b>45</b>
<b>一、 Protein complex consisting of HBx BH3-like peptide and Bcl-xL .....</b>	<b>45</b>
1. Expression of Bcl-xL protein.....	45
2. Synthesis of HBx related peptides .....	46
3. Crystallization of HBx113-135/Bcl-xL complex .....	47
4. Crystal structure analysis of HBx113-135/Bcl-xL complex.....	47
<b>二、 Studies about the functions as HBx113-135 binds to Bcl-xL.....</b>	<b>50</b>
1. Protein interaction between HBx113-135 and Bcl-xL .....	50
2. HBx113-135 alone can promote HBV replication and transcription in vitro..	54
3. HBx113-135/Bcl-xL complex affect HBV life in vivo .....	59
4. Preliminary exploration about Bcl-xL inhibitor(ABT263-737) to HBV .....	61
<b>Chapter 4: Discussion .....</b>	<b>65</b>
<b>一、 The key amino-acid residues located on interface of HBx113-135/Bcl-xL complex .....</b>	<b>65</b>
<b>二、 The influence of HBx BH3-like peptide on HBV.....</b>	<b>66</b>
<b>三、 A HBV treatment strategy targetting Bcl-xL .....</b>	<b>67</b>
<b>四、 HBV infection treatment guidance provided by this research.....</b>	<b>69</b>
<b>Summary and prospect.....</b>	<b>70</b>
<b>References .....</b>	<b>82</b>

## 摘要

乙型肝炎病毒（Hepatitis B virus, HBV）感染是全球性的医疗难题，慢性 HBV 感染可大大增加感染者罹患原发性肝细胞癌（HCC）的风险。HBx 蛋白是 HBV 基因组表达的一种多功能蛋白，在 HBV 的生命周期及其致 HCC 过程中发挥重要作用。此前研究表明，HBx 可通过其序列中的 BH3 基序结构域与宿主细胞的 Bcl-2/Bcl-XL 蛋白相互作用，导致细胞凋亡，并同时提高细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度，进而增强 HBV 复制，提示这一相互作用可能是 HBx 发挥功能效应的重要机制。本研究主要对 HBx 蛋白 BH3 结构域与 Bcl-XL 相互作用的结构基础和其功能相关关键氨基酸位点进行系统研究。

本研究主要由三部分内容组成，在第一部分中，我们通过 X 晶体衍射获得了 HBx 类 BH3 结构域肽段 HBx113-135 与 Bcl-xL 蛋白结合复合物的晶体结构数据，分辨率约为 2.15 Å，HBx113-135 形成两圈  $\alpha$  螺旋结合于 Bcl-xL。不同于已报道的 BH3 结构域蛋白与 Bcl-xL 的复合物机构，HBx 的类 BH3 结构域由非常规的 Trp120 和部分保守的 Leu123 与 Bcl-xL 通过疏水作用结合。其中 Trp120 位于由 Bcl-xL 侧链的 Phe105、Leu108、Val126 和 Phe146 形成的疏水口袋，与常规的 Bcl-xL 和 BH3 基序结合位置大约有 2 Å 的距离。根据结构数据的提示，本研究第二部分从 HBV 病毒学角度研究了 HBx113-135 与 Bcl-xL 相互作用的生物学功能。通过免疫共沉淀分析发现引入两个点突变(W120A, L123A)的 HBx113-135 与 Bcl-xL 的结合能力显著变弱，进而从 HBx113-135 多肽、全长的 HBx 以及 HBV 复制子三个层面分析 HBx 与 Bcl-xL 结合对于 HBV 复制能力的影响。利用多肽载体 pep-1 将 HBx113-135 转染至细胞内，发现其可以有效恢复 HBx 基因缺失的 HBV 复制子(pHBV1.3-Xnull)的复制能力，而与 Bcl-xL 结合能力变弱的 WLAA 突变多肽则丧失了拯救 pHBV1.3-Xnull 复制能力的功能；利用过表达全长的 HBx 验证了同一结论。进一步构建 WLAA 突变型的 HBV 复制子，在小鼠体内也验证了这一结论，WLAA 突变型的 HBV 复制子在尾静脉高压注射到小鼠体内后，肝脏及外周血血清中病毒蛋白的表达量基本与 pHBV1.3-Xnull 对照组持平。通过前两部分的研究内容可以推断 HBx113-135 肽段通过与 Bcl-xL



的相互作用，足以发挥促进 HBV 复制及表达的功能，120 Trp 和 123 Leu 是二者相互作用的结构上和功能上的关键氨基酸位点，其突变可显著削弱二者结合，进而导致 HBx 的功能丧失。基于此结论，研究第三部分中在体外评估传统的 Bcl-xL 小分子抑制剂 ABT263/ABT737 对于 HBV 复制水平及病毒蛋白水平的影响，并未观察到显著的抑制效果，提示传统的 Bcl-xL 小分子抑制剂尚无法成为抗 HBV 的候选新药，本研究提供的精细结构数据可能可以用于指导新的小分子化合物的开发。

综上所述，本研究获得了迄今分辨率最高的 HBx 肽段与 Bcl-xL 复合物结构数据，发现 HBx 的类 BH3 结构域通过疏水作用结合于 Bcl-xL 的非常规 BH3 基序结合口袋，结合界面的关键氨基酸为 Trp120 和 Leu123。通过对野生型 HBx 及 W120A/L123A 突变 HBx 的功能研究，发现 HBx 的类 BH3 结构域对于 HBV 的复制和转录相当重要。本研究首次发现 HBx 的类 BH3 多肽具有恢复 HBx 基因缺失的 HBV 复制子(pHBV1.3-Xnull)复制能力的功能，而相应的 W120A/L123A 突变多肽则丧失了该功能。本研究进一步发现现有的 Bcl-xL 抑制剂并不能有效抑制 HBV，我们获得的结构数据可为针对 HBx 与 Bcl-xL 相互作用这一途径的新药分子设计提供指导，例如利用类似 BH3 结构域的多肽干扰 HBx 与 Bcl-xL 的结合，从而抑制 HBV。因此，本研究对于 HBx 在 HBV 病毒学方面的功能及其分子机制有了进一步的认识。

关键词：乙肝病毒 (HBV); HBx; Bcl-xL

## Abstract

Hepatitis B virus (HBV) infection is a global medical problem. Chronic hepatitis B carriers (CHB) have a higher risk of developing into hepatocellular carcinoma (HCC). HBx is a multifunctional protein encoded by HBV genome, and plays an important role in HBV life cycle and occurrence of HCC. Recent studies have shown that the cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration increased obviously after HBx interacting with anti-apoptotic Bcl-2 through BH3-like domain and thus promoted HBV replication and cell apoptosis. It suggests that interaction between HBx BH3-like domain and Bcl-xL may explain how HBx functions in HBV life.

This research paper consists of three main sections. First, we get the crystal structure of HBx BH3-like peptide (HBx113-135) in complex with Bcl-xL by X-ray crystallography reaching 2.15 Å resolution. Unlike other published structures of Bcl-xL in complex with BH3-domain proteins, the HBx BH3-like motif binds Bcl-xL via hydrophobic interactions mediated by a noncanonical Trp120 residue and a partially conserved Leu123 residue. The Trp120 residue snuggles into a hydrophobic pocket formed by the side chains of Phe105, Leu108, Val126 and Phe146 from Bcl-xL, which is ~2Å away from the canonical binding pocket of Bcl-xL for the BH3 motif. Basing the structural data, we pay attention on functional analysis about interaction between HBx113-135 and Bcl-xL in the second section. It suggests that the HBx113-135 harboring the W120A/L123A almost completely loses ability to bind Bcl-xL using co-immunoprecipitation (co-IP) assay. And we have studied the influence of interaction between HBx and Bcl-xL on HBV life from three perspectives of HBx113-135 peptide, HBx protein and HBV replicon. In HBV replication rescue assay, the wild type HBx113-135, but not a mutant HBx peptide (W120A/L123A), is sufficient to promote HBV viral replication and protein expression. Same conclusion can be reached in rescue assay by full-length HBx protein. Consistent with the rescue assay result, pHBV1.3-WLAA replicons can't proliferate successfully after being

hydrodynamically injected into the C57BL/6, the expression levels of intrahepatic HBsAg/HBcAg and serum HBsAg/HBeAg are comparable to the control levels. Finally we can reach the conclusion that HBx interacts directly with anti-apoptotic Bcl-xL proteins through its BH3-like motif to promote HBV viral replication, and the key interface residues, Trp 120 and Leu 123 on HBx113-135, are critical for HBx113-135/Bcl-xL complex formation and HBV activity. At last, we break the HBx and Bcl-xL interaction with traditional Bcl-xL inhibitors ABT263/ABT737, but no noticeable anti-HBV effect can be observed. We consider that traditional Bcl-xL inhibitors are not ideal candidates for HBV treatment. Our research can provide guidance for new anti-HBV compounds development.

Put it all together, we obtain the highest-resolution structural data of HBx113-135/Bcl-xL complex. HBx BH3-like motif binds Bcl-xL via hydrophobic interaction, Trp 120 and Leu 123 are the key amino acids. Mutations of the key interface residues in the HBx BH3-like domain demonstrate that the HBx BH3-like domain is fatal important for HBV replication and transcription in Vitro and in Vivo. Our research has found that HBx BH3-like domain can rescue the replication of X gene-deficient HBV replicon (pHBV1.3-Xnull) for the first time. Traditional Bcl-xL inhibitors can't effectively inhibit HBV. These results can not only deepen our understanding about the pathogenesis of the HBV infection, they also provide a new strategy to treat chronic HBV-induced disease by interfering through BH3-like peptidomimetics.

Key words: hepatitis B virus(HBV); HBx; Bcl-xL

## 缩写词

- HBV: Hepatitis B virus, 乙型肝炎病毒
- CHB: Chronic hepatitis B, 慢性乙型肝炎
- ORF: Open reading frame, 开放阅读框
- HCC: Hepatocellular carcinoma, 肝细胞癌
- HBsAg: Hepatitis B surface antigen, 乙肝表面抗原
- HBcAg: Hepatitis B core antigen, 乙肝核心抗原
- HBeAg: Hepatitis B e antigen, 乙肝 e 抗原
- HBx: Hepatitis B X protein, 乙肝 X 蛋白
- NTCP: sodium taurocholate cotransporting polypeptide, 钠离子-牛磺胆酸共转运蛋白
- pgRNA: pregenomic RNA, 前基因组 RNA
- rcDNA: relaxed circular DNA, 松弛环状 DNA
- cccDNA: covalently closed circular DNA, 共价闭合环状 DNA
- Bcl-2: B-cell lymphoma-2, B 淋巴瘤细胞抗原 2
- Bcl-xL: B-cell lymphoma-extra large, B 淋巴细胞抗原 xL
- NK: natural killer cell, 自然杀伤细胞
- CTL: cytotoxic T lymphocyte, 细胞毒 T 淋巴细胞
- IRF: interferon regulatory factor, 干扰素调节因子
- IPS-1: interferon  $\beta$  promoter stimulator-1,  $\beta$  干扰素启动子激动剂 1
- MAVS: mitochondrial antiviral signaling protein, 线粒体抗病毒信号蛋白
- HepG2: 人肝癌细胞系
- TBP: TATA box binding protein, TATA 结合蛋白
- CDKs: cyclin-dependent protein kinases, 周期蛋白依赖性激酶
- PKC: protein kinase C, 蛋白激酶 C
- Caspase: 含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶
- WHV: woodchuck hepatitis B virus, 土拨鼠乙肝病毒

GSHV: 地松鼠肝炎病毒

MTI-MMP: 膜型基质金属蛋白酶-1

RNAi: RNA interfer, RNA 干扰

NF- $\kappa$ B: nuclear factor  $\kappa$ B, 核转录因子  $\kappa$ B

ALT: Alanine aminotransferase, 谷丙转氨酶

Co-IP: Co-Immunoprecipitation, 免疫共沉淀

IPTG: Isopropyl  $\beta$ -D-1-Thiogalactopyranoside, 异丙基- $\beta$ -d-硫代半乳糖苷

FITC: Fluorescein Isothiocyanate, 异硫氰酸荧光素

## 第一章 前言

自从 1982 年第一支乙肝预防性疫苗成功使用以来,世界范围内的乙肝发病人数已经大大减少。但是据研究表明在 2010 年,世界范围内仍有 2.5 亿慢乙肝患者(CHB)<sup>[1]</sup>,其中的 75%患者分布于亚太地区,乙型肝炎仍是全球一大健康难题。乙肝患者伴随年龄增长往往会出现肝代谢失偿、肝硬化及肝癌(HCC)等严重性疾病。据统计,全球每年约有一百万人死于乙肝引起的肝脏性疾病<sup>[2]</sup>。

乙型肝炎病毒蛋白 HBx 是一种多功能蛋白,在 DNA 修复、调节细胞的增殖转化和凋亡、肝细胞癌变等方面发挥重要作用<sup>[3]</sup>。有实验表明,在体外部分细胞系及体内测试中,HBx 对促进肝细胞内 HBV 的复制及转录发挥十分重要的影响<sup>[4]</sup>。针对乙型肝炎的各种研究仍将继续及备受关注。

### 一、乙型肝炎病毒概述

#### 1. HBV 病毒基因组及病毒结构

乙肝病毒是一种 DNA 病毒,属于嗜肝 DNA 病毒科。嗜肝 DNA 病毒科可以细分为哺乳动物的正嗜肝 DNA 病毒和水禽类嗜肝 DNA 病毒<sup>[5]</sup>。嗜肝 DNA 病毒的特点是宿主范围狭窄,人的 HBV 病毒株只能感染高等灵长类动物,例如黑猩猩,有时还会感染树鼩。

HBV 是迄今为止发现的最小的人类 DNA 病毒,它的基因组是一条 3.2Kb 的部分环状双链 DNA,其中完整的负链有确定的 5'和 3'端,病毒聚合酶就是与负链的 5'端进行结合进行转录产生 mRNA。负链的 3'端有 5-8 个碱基与 5'端的碱基序列重复,称为末端重复序列,它们与正链 DNA 一起形成一小段三链结构<sup>[6]</sup>。正链 DNA 的 5'端形成类似 mRNA 的帽子结构,并且位置固定<sup>[7]</sup>,正链长度不一,在正链 5'端和负链 3'端各有一个 11 个碱基组成的完全重复重复序列,分别称为 DR1 和 DR2,在病毒基因组整合入宿主基因组中起到重要作用<sup>[8]</sup>。

HBV 的 DNA 负链共有四个阅读框(ORF),共编码 7 种病毒蛋白。S 阅读框分为前 S1、前 S2 和 S 区,共编码大蛋白(LHBs)、中蛋白(MHBs)和小蛋白(SHBs)

<sup>[9]</sup>；C 阅读框分为前 C 区和 C 区，C 区碱基序列最为保守，常常是免疫攻击的靶点，C 阅读框编码 HBcAg 和 HBeAg<sup>[10]</sup>；P 阅读框是最长的阅读框，与 C 阅读框及 X 阅读框有部分重叠，与 S 阅读框完全重叠，P 基因编码末端蛋白、反转录酶和 RNA 酶 H；X 阅读框编码 HBx，是一种多功能蛋白<sup>[11]</sup>。基因组除了编码蛋白的结构基因外，还包括启动子、增强子等一些调节原件（图 1-1）。

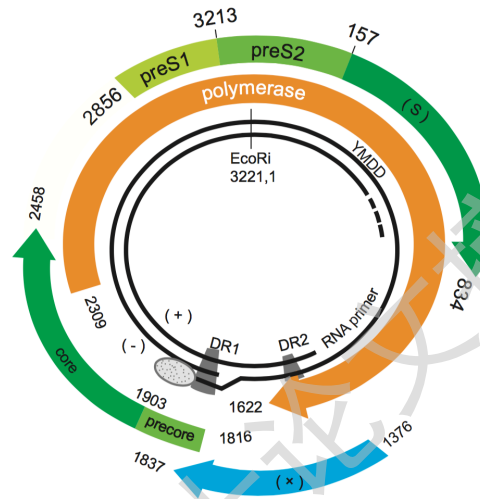


图 1-1 HBV 基因组示意图<sup>[12]</sup>

Fig.1-1 The schematic of HBV genome

HBV 的病毒相关颗粒以三种形式存在：Dane 颗粒、球形颗粒和管状颗粒<sup>[13]</sup>。Dane 颗粒为直径 42-45nm 的双层球状颗粒，外层为由 HBs 表面蛋白和脂质构成的病毒外膜。内层蛋白壳常常被称为核心颗粒<sup>[14]</sup>，主要由 HBc 蛋白组成，包裹着病毒的基因组及聚合酶。在形态学上核心颗粒有 T=3 和 T=4 两种对称形态，但二者在功能上并没有差别<sup>[15]</sup>。Dane 颗粒是唯一具有感染力的病毒颗粒。球形颗粒往往在严重病毒血症的患者血清中大量存在，是一种由 HBs 构成的直径为 17-25nm 的小球状颗粒，相比而言，管状颗粒的分泌量要远远低于球形颗粒。球形颗粒和管状颗粒属于亚病毒结构，因此并不具有感染能力<sup>[14]</sup>。分析这三种 HBV 的颗粒蛋白成分发现，SHBs 的总含量最高，MHBs 的含量最少，LHBs 在 Dane 颗粒和管状颗粒中的含量较多，但是球形颗粒中含量较少，LHBs 的比例往往决定了主要的 HBV 病毒颗粒形式。

## 2. HBV 病毒蛋白及其功能

HBV 病毒基因组虽然只有 3.2Kb，却可以高效率得编码 9 种病毒蛋白，按

照对应得编码阅读框可以将这9种蛋白分为四大类,由S阅读框编码得外膜蛋白、C阅读框编码得核心结构蛋白HBcAg和分泌性蛋白HBeAg、由P阅读框编码得P蛋白三种和由X阅读框编码得多功能蛋白HBx。

外膜蛋白HBs主要包括大蛋白(preS1+preS2+S)、中蛋白(preS2+S)和主蛋白(S)。主蛋白由226个氨基酸构成,包括了外膜蛋白得全部抗原反应性<sup>[16]</sup>,中蛋白在主蛋白得基础上扩增了55个氨基酸长度得preS2区<sup>[17]</sup>,大蛋白在中蛋白得基础上又延长了119个氨基酸得preS1区。因为大蛋白中得preS1区域暴露于病毒颗粒得最表面<sup>[18]</sup>,所以病毒颗粒试图进入肝细胞时,preS1区得氨基端最先与肝细胞膜接触,并且其部分氨基酸区段能被肝细胞受体NTCP特异性识别,因此大蛋白得preS1区常常被认为在病毒入胞过程中发挥重要作用<sup>[19]</sup>。主蛋白在病毒外膜中占了极大部分,在病毒颗粒得组长中起主要作用,过剩得主蛋白常常形成管状或者球形颗粒。主蛋白有一个包含二硫键的高构象型免疫优势表位,是抗HBs的多克隆抗体的主要免疫靶标,疫苗接种者评估疫苗应答成熟的标准也是测试血清中是否产生高滴度的这一表位中和抗体<sup>[20]</sup>。中蛋白在外膜中也有弥散,但是其中所含的preS2区域对病毒组装和传染并非必须<sup>[21]</sup>,针对中蛋白的功能研究也尚不十分清楚。

HBV的核心蛋白有两种形式:结构蛋白HBcAg和分泌性蛋白HBeAg。以B型HBV为例,其HBcAg由183个氨基酸残基组成,首先构成同型二聚体,90或120个二聚体再自发组装成20面体的核壳结构<sup>[22]</sup>。在HBcAg的C端包含一段精氨酸富集区,位于组装后核壳的内部,这段序列对RNA的包裹意义重大<sup>[23]</sup>。HBcAg包裹DNA形成的核心颗粒是HBV生活史的核心部分,它或者被包膜包裹形成成熟的病毒颗粒,或者重新转移的宿主细胞核从而导致肝细胞中HBV核酸的持续性存在<sup>[24]</sup>。有研究发现一定比例的核心蛋白进入到细胞核内后会组装成空心颗粒,因为核心蛋白有结合核酸的功效,故推测通过控制空心核心颗粒的组装比例来调节基因组的RNA翻译等过程<sup>[25]</sup>。HBeAg在HBcAg序列的基础上多了一段29个氨基酸的分泌信号肽,而后其转移到内质网腔内,被切除掉信号肽中的19个氨基酸,剩余的10个氨基酸用于阻止HBeAg组装进核心颗粒<sup>[26]</sup>。HBeAg并不是病毒生活史中必需的,但有研究发现,HBeAg可以导致HBeAg和HBcAg特异的Th1细胞的耗竭<sup>[27]</sup>,而此类免疫细胞是病毒清除所必需的,所



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.